

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **09151200 A**

(43) Date of publication of application: **10.06.97**

(51) Int. Cl

**C07K 14/705
A61K 35/14
A61K 35/76
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 38/00
A61K 39/00
A61K 48/00
C07K 7/06
C12N 1/21
C12N 7/00
C12N 15/09**

//(C12N 1/21 , C12R 1:19)

(21) Application number: **08217140**

(22) Date of filing: **19.08.96**

(30) Priority: **29.09.95 JP 07253491**

(71) Applicant: **AJINOMOTO CO INC KIKUCHI KOKICHI**

(72) Inventor: **KIKUCHI KOKICHI
SATOU NORIYUKI
SAWARA HIROMASU
YASOJIMA TAKAHIRO
WADA YOSHIMASA
SUZUKI MANABU
HAMURO JUNJI**

(54) PEPTIDE CAPABLE OF INDUCING IMMUNE RESPONSE TO HUMAN GASTRIC CANCER, THERAPEUTIC AND PREVENTIVE AGENT FOR HUMAN GASTRIC CANCER CONTAINING THE SAME

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new peptide, as a fragment of a gastric cancer antigen protein existing in a human gastric cancer cell, capable of bonding to an HLA molecule and inducing a cytotoxic T-cell subpopulation to target the gastric cancer cell, useful as a vaccine for treating and preventing human gastric cancer.

SOLUTION: This new peptide is a fragment of a gastric cancer antigen protein existing in a human gastric cancer cell, which fragment can bind to an HLA molecule such as HLA-A31 and induce a cytotoxic T-cell subpopulation

to target a gastric cancer cell. A preparation containing the peptide is effective as a preventive and a therapeutic agent for preventing and treating gastric stomach cancer. A virus or a bacterium transformed with a recombinant DNA containing a DNA coding the peptide is expected to have sufficient pharmacodynamic effects as a vaccine for treating and preventing human gastric cancer. The peptide is obtained by inoculating a human gastric cancer cell strain HST-2 on a medium, culturing the strain in a 5% CO₂ gas at 37°C for 4 days, removing the supernatant liquid of the culture, adding 0.1% trifluoroacetic acid solution to the residue, liberating an HLA- bonded peptide from the HLA molecule and loading the peptide on a reversed phase HPLC column.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-151200

(43)公開日 平成9年(1997)6月10日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 K 14/705			C 07 K 14/705	
A 61 K 35/14			A 61 K 35/14	Z
35/76			35/76	
38/00	ABA		39/00	ADUH
	ACJ		48/00	

審査請求 未請求 請求項の数11 OL (全 9 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-217140	(71)出願人	0000000066 味の素株式会社 東京都中央区京橋1丁目15番1号
(22)出願日	平成8年(1996)8月19日	(71)出願人	595138867 菊地 浩吉 北海道札幌市中央区伏見3丁目7番1号
(31)優先権主張番号	特願平7-253491	(72)発明者	菊地 浩吉 北海道札幌市中央区伏見3丁目7番1号
(32)優先日	平7(1995)9月29日	(72)発明者	佐藤 昇志 北海道札幌市豊平区福住二条九丁目13番3号
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ヒト胃癌に対する免疫応答を誘導できるペプチド及び該ペプチドを含むヒト胃癌治療、予防剤

(57)【要約】

【課題】ヒト胃癌に対して有効CTLを引き起こすペプチドの提供である。

【解決手段】特定のアミノ酸配列を有するペプチドが胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を誘導する。従つて該ペプチドは胃癌に対する治療、予防剤として期待される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒト胃癌細胞中に存在する胃癌抗原蛋白質の断片であり、該断片がHLA分子に結合し、かつ胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を誘導しうるペプチド。

【請求項2】 HLA分子がHLA-A31である請求項1記載のペプチド。

【請求項3】 該ペプチドが配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有する請求項1記載のペプチド。

【請求項4】 該ペプチドが胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞をより効率的に誘導可能にする為に、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有する請求項1記載のペプチド。

【請求項5】 該ペプチドが配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有する請求項4記載のペプチド。

【請求項6】 ヒト胃癌細胞中に存在する胃癌抗原蛋白質の断片であり、該断片がHLA分子に結合し、かつ胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を誘導しうるペプチドを含有するヒト胃癌治療、予防剤。

【請求項7】 HLA分子がHLA-A31である請求項6記載のヒト胃癌治療、予防剤。

【請求項8】 該ペプチドが配列表の配列番号1又は2記載のアミノ酸配列を有する請求項6記載のヒト胃癌治療、予防剤。

【請求項9】 請求項1又は4記載のペプチドをコードするDNA。

【請求項10】 請求項3又は5記載のペプチドをコードするDNA。

【請求項11】 請求項9又は10記載のDNAを有する組換えウイルス又は組換え細菌を含むヒト胃癌治療、予防用ワクチン。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、ヒト胃癌細胞に対するCTL (Cytotoxic T Lymphocytes、医科免疫学(改訂第3版)菊池浩吉編集、参照)をin vivo又はin vitroにおいて誘導可能なペプチド及び該ペプチドをコードするDNAに関する。更に詳しくは、HLA-A31抗原(Human Leucocyte Antigen、現代免疫学(第2版)、山村雄一、多田富雄編集、参照)と結合することによりヒト胃癌細胞に対するCTLを提示され得るペプチド及び該ペプチドをコードするDNAに関する。また、本発明はヒト胃癌細胞に対するCTLをin vivo又はin vitroにおいて誘導可能なペプチドを含有するヒト胃癌治療、予防剤、及び該ペプチドをコードするDNAを含む組換えウイルス又は組換え細菌を含むヒト胃癌治療、予防用ワクチンに関する。

【0002】

【従来の技術】悪性腫瘍に対する薬物療法としては、腫瘍細胞に直接傷害性を示す化学療法剤や、宿主の免疫能

を非特異的に賦活化し、宿主の生体防御機能を増強することにより治療を行おうとする免疫療法剤などが用いられている。しかし、現在までに悪性腫瘍、特に消化器腫瘍に対し、完全に治癒を誘導することができる薬剤は存在しないのが現状である。

【0003】近年、マウスを中心とした動物腫瘍モデルを用いた研究より、種々の腫瘍細胞上に存在する腫瘍関連抗原、腫瘍特異抗原に対する抗原特異的な免疫応答を増強する事により、腫瘍を完全に治癒する事が可能であることが明らかになり、臨床においても、これら腫瘍特異抗原に対する抗原特異的な免疫応答を増強することにより治療を行おうとする試みが行われている。

【0004】これらの癌抗原特異的な免疫応答を増強することにより癌治療を行おうとする薬剤及び試みとして、腫瘍細胞で発現し、主にB細胞により認識される抗原に対するモノクローナル抗体を用いたもの、放射線もしくは薬剤により不活化した自己の腫瘍細胞もしくはそれらの可溶化画分をワクチンとして、患者自身に投与することにより腫瘍に対する特異的免疫応答を誘導しようとするもの、更に腫瘍細胞の免疫原性を高めるために腫瘍細胞にウイルスや種々のサイトカイン遺伝子を導入した後に患者自身に投与することにより腫瘍に対する特異的免疫応答を誘導しようとするものなどが報告されている。

【0005】しかしながら、生体内で腫瘍拒絶に主に作用するのがCTLを始めとするT細胞である事が明らかになりつつあり、現在ではB細胞認識抗原に対する抗体を用いた治療法では限界があることが明らかにされた。また、T細胞による免疫応答は、T細胞集團中に存在する2つの機能的亜集團(Th1, Th2サブセット)の活性化状態で増強的にも、抑制的にも作用する事が明らかにされ、複数の抗原を含む腫瘍細胞自体の免疫は腫瘍細胞に対する免疫応答を逆に抑制する場合もあることが明らかになってきた。さらに、不活化腫瘍細胞の接種は、生体内での再活性化による腫瘍の再増殖の可能性も完全には否定し得ず、安全性の問題が残る。

【0006】以上のような問題点を回避する為には、腫瘍拒絶に対し、中心的役割を果たすと考えられているCTLを活性化する抗原タンパク質を同定し、本抗原タンパク質を用いてCTLを活性化する方法が考えられている。

【0007】近年の研究の進歩によりCTLの誘導は、細胞内のタンパク質分解酵素により断片化された抗原タンパク質由来の8ないし12残基のアミノ酸より構成されるペプチドがHLA抗原と結合することにより、CTLへの抗原提示分子として作用することにより行われることが明らかにされた。

【0008】従って、癌抗原ペプチドに於いても、HLA分子と結合し、腫瘍細胞に対するCTLを誘導可能なペプチドを発見できれば、これを癌に対する治療、予防剤として使用することが可能になると考えられる。

【0009】このような考えのもと、CTLを誘導可能な癌抗原ペプチドの検索が行われているが、現在までに明らかになっているものは、いずれもメラノーマ腫瘍中に存在する癌抗原であるMAGE family, Mart-1, Thyrosinase, gp100タンパク質由来のペプチドのみであり、胃癌を始めとする消化器癌に対しては、CTLを誘導可能な癌抗原ペプチドが存在するか否か、ましてその癌抗原ペプチドの構造は全く明らかにされていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、1)ヒト胃癌に対する免疫応答を誘導できるペプチドの提供、2)上記ペプチドをコードするDNAの提供、3)上記ペプチドを含有するヒト胃癌治療、予防剤の提供、及び4)上記ペプチドをコードするDNAを有する組換えウイルス又は組換え細菌を含むヒト胃癌治療、予防用ワクチンの提供である。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明者等は腫瘍細胞に対する生体防御機構として、腫瘍抗原を認識するCTLが大きな役割を果たしていることに着目した。即ち、ワクチンの一部として使用可能なペプチド又はそれをコードするDNAを含む形質転換体によりこのCTLを効率的に誘導することが癌の治療、予防に有効であることに着目し、研究を進めた。

【0012】このCTLの誘導は、HLA抗原が癌抗原ペプチドと結合し、CTLへの抗原提示分子として機能することにより行われることが知られている。従って、HLA抗原と結合し、胃癌細胞と反応するCTLを活性化することが可能なペプチドを発見できれば、これを胃癌の治療、予防剤として使用することが可能になると考えられる。

【0013】本発明者らは、胃癌細胞に対し、HLA-A31拘束性に特異的に反応する胃癌患者由来のCTL細胞株(Tc-HST-2)及び、本CTLが作用する同一患者由来の胃癌細胞株(HST-2)の樹立に成功している(J. Immunol. Meth. 154: 235-243, 1992, Cancer 75:1484-1489, 1995)。

【0014】しかしながら、このCTLが腫瘍抗原を認識しているか、更にはいかなる抗原を認識しているかは明らかにされていなかった。また、胃癌を始めとする消化器癌に特異的に存在し、CTLを誘導可能な癌抗原ペプチドの存在そのもの、まして物質的本体も全く明らかにされていなかった。

【0015】そこで、本発明者らは、胃癌細胞HST-2細胞表面上に存在するHLA結合ペプチドを精製し、CTL細胞株Tc-HST-2を活性化するペプチドを同定した。更に、同定した本ペプチドを常法に従い、化学的に合成した。係るペプチドは、CTL細胞株Tc-HST-2を実際に活性化することを初めて解明した。また、本ペプチドがHST-2以外の胃癌細胞にも発現していることも発見した。以上の結果より本ペプチドが、胃癌の治療、予防剤としての利用可能が極めて高いことを明らかにした。本発明は、かか

る発見に基づき完成するに至ったものである。

【0016】即ち、本発明は、1)ヒト胃癌細胞中に存在する胃癌抗原蛋白質の断片であり、該断片がHLA分子に結合し、かつ胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を誘導しうるペプチド、2)該ペプチドを含有するヒト胃癌治療、予防剤、3)該ペプチドをコードするDNA、及び4)該DNAを有する組換えウイルス又は組換え細菌を含むヒト胃癌治療、予防用ワクチンである。

【0017】

10 【発明の実施の形態】以下に本発明について詳細に説明する。

【0018】本発明に於いて用いられるヒト胃癌細胞中に存在する胃癌抗原タンパク質の断片であり、該断片がHLA分子に結合し、かつ胃癌細胞を標的とする細胞傷害性T細胞を誘導し得るペプチドを同定するためには、

(1) *in vitro*で大量増殖可能なHLA型の判明したヒト胃癌細胞株と、(2)該細胞株に対しHLA分子及びT細胞受容体拘束性に反応し、細胞障害活性を示す*in vitro*で大量増殖可能なCTL細胞株の樹立が必須である。

20 【0019】*in vitro*で大量増殖可能なHLA型の判明したヒト胃癌細胞株としては、例えば本発明者らにより樹立されたHST-2細胞(J. Immunol. Meth. vol. 154, p 235-243 (1992)、Jpn. J. Cancer Res. vol. 84, p 906-913 (1993))を用いることができる。本細胞は胃癌患者の癌性腹水より樹立された胃印環細胞癌株である。

【0020】また、該細胞株に対しHLA分子及びT細胞受容体拘束性に反応し、細胞障害活性を示す*in vitro*で大量増殖可能なCTL細胞株としては、同様に本発明者らにより樹立されたTc-HST-2細胞(J. Immunol. Meth. vo

30 l. 154, p 235-243 (1992)、Jpn. J. Cancer Res. vo l. 84, p 906-913 (1993))を用いることができる。本CTL細胞株がHST-2細胞と特異的に反応すること及び、本CTL細胞株がHST-2抗原とHLA-A31抗原を同時に認識することは、Cancer vol. 75, p1484-1489 (1995)に記載されている。

【0021】Tc-HST-2細胞のCTL活性を誘導可能な胃癌抗原ペプチドを含むHLA結合ペプチドを得るためにHST-2細胞を用いることができる。即ち、HST-2細胞を一般的に用いられる培養条件、たとえばウシ胎仔血清を含む

40 RPMI1640培地にて培養した後、PBS(Phosphate-Buffer Saline)で洗浄後、0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)溶液で、細胞表面上に存在するHLA分子に結合しているペプチドを効率的に抽出する。TFAを用いたHLA結合ペプチドの抽出法はScience vol. 249, p 283-287 (1990)に記載されている。

【0022】Tc-HST-2細胞のCTL活性を誘導可能な胃癌抗原ペプチドの精製は逆相クロマトグラフィーを用い、上述のHLA結合ペプチドより精製できる。本胃癌抗原ペプチドの精製法に関しては後述の実施例で詳しく述べる。

【0023】逆相クロマトグラフィーにより分離したHLA結合ペプチド画分中のTc-HST-2反応性胃癌抗原ペプチドの同定法としては、Science vol. 249, p 283-287 (1990)に記載された方法と同様の方法を用い各画分中のCTL誘導活性を測定することにより同定することができる。即ち、HLA-A31陽性のHST-2もしくはKG-1細胞を⁵¹Crを含むクロム酸ナトリウムで放射線標識した後、逆相クロマトグラフィーで分離したHLA結合ペプチドと混合し、3時間37度で培養した後、Tc-HST-2を加え、更に12時間培養し、上清中に放出される⁵¹Crの放射活性を測定することによりCTL誘導活性を検出することができる。

【0024】逆相クロマトグラフィーにより分離されたTc-HST-2細胞のCTL活性を誘導可能な胃癌抗原ペプチドは、常法に従い、固相法プロテインシーカンサーを用いそのアミノ酸配列を決定することができる。CTL誘導活性を示すペプチドとして同定されたペプチドとしては、例えば配列表の配列番号1記載のペプチドを例示することができる。

【0025】配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドを本発明に於いて用いることは言うまでもない。また、ヒト胃癌細胞中に存在する胃癌抗原タンパク質の断片であり、該断片がHLA分子に結合し、かつ胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を誘導可能なペプチドであれば、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有するペプチドも用いることができる。

【0026】さて、本発明に於ける配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有するペプチドとは、具体的には、(1)配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列中の1個以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換したもの、(2)配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するペプチドのN又はC末端から1個以上のアミノ酸を削除したもの、(3)更には、配列表の配列番号1に示されるアミノ酸配列を全配列中的一部に有するペプチド等である。尚、本発明に於いて、ペプチドとはアミノ酸が数個結合したものからタンパク質のようにアミノ酸が多数結合したものまで含む事にする。念の為に申し述べるが、配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有するペプチドでも、胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を誘導可能なペプチドで無ければ本発明に於いて用いることが出来ない。例えば、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有するペプチドは本発明に於いて用いることが出来るが、配列表の配列番号3又は4記載のアミノ酸配列を有するペプチドは、CTL誘導活性が無いので用いることが出来ない(後述の実施例参照)。

【0027】当該ペプチドの製造法は特に限定されるものではない。例えば、固相法ペプチド合成技術を用いて合成してもよく、又組換えDNA技術を用いて製造しても構わない。具体的には、配列表の配列番号1、2等に

示される胃癌細胞を標的とするCTLを誘導可能なペプチドを通常の固相法ペプチド合成技術を用いて合成してもよく、又当該ペプチドを構成するアミノ酸をコードするDNAを適当な発現ベクターに接続し、これによって形質転換されたBCG菌やエシェリヒア属細菌等の細胞を培養することによっても製造できる。

【0028】尚、配列表の配列番号1又は2記載のアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNAは、当該アミノ酸配列より演繹できる。各アミノ酸配列に対応する10コドンは当業者において周知であることは言うまでもない。

【0029】尚、本発明のペプチドはすべて、逆相HPLCで精製し、逆相HPLCで单一成分であることを確認したのち、質量分析により確認した上でCTLアッセイに用いた。

【0030】本発明のペプチドは、胃癌細胞特異的CTL株Tc-HST-2に対し、CTL活性を誘導することが出来る。CTL誘導活性の測定法としては、前述のクロム遊離法を用いることもできるが、Immunogenetics vol. 35, p145(1992)に記載されているTNF遊離法を用いて検定することもできる。即ち、TNF遊離法とはHLA-A31陽性のHST-2もしくはKG-1細胞と、本発明のペプチドとを混合し、37度で3時間培養した後、Tc-HST-2を加え、更に12時間培養し、上清中に放出されるTNF活性を測定することによりCTL誘導活性を検出する方法である。

【0031】尚、TNF活性の測定はImmunogenetics vol. 35, p145(1992)に記載される方法で測定することができる。即ち、TNF感受性のWehi164細胞と検定サンプルを混合し、24時間培養した後、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)溶液を加え、更に3時間培養しミトコンドリア内で変換されたホルマザンをacid propanolで溶解したのち、その生成量を吸光度(OD570)で測定することによりTNF活性を検定することができる。

【0032】本願発明に係るペプチド、例えば配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドは、T細胞エピトープとして胃癌細胞特異的CTLを誘導することができるので、ヒト胃癌の治療、予防剤として非常に期待できる。実際の使用法としては、1)本発明のペプチドをそのまま、又は2)医薬的に許容される担体及び/又は希釈剤とともに、3)更に必要ならば、下記のような補助剤も加えて、注射器で投与することもできるし、噴霧などの方法で粘膜からの経皮吸収などで投与してもよい。尚、ここで言う担体とは例えば、ヒト血清アルブミンであり、又、希釈剤とは例えばPBS、蒸留水等である。

【0033】本発明のヒト胃癌治療、予防剤中には、ヒト胃癌細胞中に存在する胃癌抗原蛋白質の断片であり、該断片がHLA分子、具体的にはHLA-A31分子に結合し、かつ胃癌細胞を標的とする細胞障害性T細胞を

誘導しうるペプチドを0.01—100重量%、好ましくは0.1—95%含有させる。

【0034】また、投与量は成人1人当たり、本発明に係るペプチドを1回0.01mg~100mgの範囲になるように投与する。もちろん、上記範囲はあくまでも目安であり、これに限定されるものではない。製剤の形態も特に限定されない。従って、凍結乾燥したものや、糖などの賦形剤を加えて顆粒にしたものなどでよい。また、本製剤は上記投与方法で問題となる重篤な急性毒性はない。

【0035】さて、本剤に添加してCTL誘導活性を高める補助剤としては、BCG菌などの菌体成分、Nature, vol. 344, p873 (1990)に記載されるISCOM、J. Immunol. vol. 148, p1438 (1992)に記載されるサポニン系のQS-21、リポソーム、水酸化アルミニウムなどが利用できる。

【0036】また、レンチナン、シゾフィラン、ピシバニールなどの免疫賦活剤も補助剤として用いることができる。また、IL-2, IL-4, IL-12, IL-1, IL-6, TNFなどのT細胞の増殖、分化を増強するサイトカイン等も補助剤として用いることができる。

【0037】このような方法で生体内にCTLなどの免疫応答を誘導できることは上記記載のそれぞれの文献やScience, vol. 255, p333 (1992)などに記載されていることも付記しておく。

【0038】患者から採取した細胞または、同一のHLAパブロタイプを持つ細胞に試験管内で当該抗原ペプチドを加え、抗原提示させた後、患者血管内に投与し、患者体内で効果的にCTLを誘導することもできる。また、患者末梢血リンパ球に当該ペプチドを加えて試験管内で培養することにより試験管内でCTLを誘導した後に患者血管内に戻すこともできる。このような細胞移入による治療は既に癌治療法として実施されており、当業者間ではよく知られた方法である。

【0039】また、本発明で明らかにされた胃癌抗原ペプチドをコードするDNAを適当なベクターに組み込み、この組換えDNAを有するワクシニアウイルス等のウイルス又はBCG菌等の細菌はヒト胃癌治療、予防用生ワクチンとして有効に利用できる。すなわち、これらの組換えウイルス又は組換え細菌において発現させる抗原タンパク遺伝子中に(1)配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列を有するペプチドをコードするDNA又は(2)配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有するペプチド(例えば、配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有するペプチド)をコードするDNAを組み込んでおけば、該ペプチド配列が抗原タンパク質の一部として発現された後、細胞内でプロセスされてHLA抗原に提示され、これを認識するCTLを誘導することができる。尚、投与量、投与法は通常の種痘やBCGワクチンと変るところはない。

【0040】

【実施例】実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例により何ら限定されるものでない。

【0041】実施例1 HST-2からのTc-HST-2応答ペプチドの精製及び同定

175cm²プラスチック培養器(Falcon社cat. No. 3028)中の50mlの10%FCS含有RPMI1640培地(2mMグルタミン、5X10⁻⁴M 2ME、100単位/mlペニシリソ、100μg/mlストレプトマイシン、16mMNaHCO₃含有)に2X10⁶/ml細胞数にHST-10 2を接種し、5%CO₂ガス下、37℃で4日間培養した。培養後、培養上清を除き、PBS(-)で洗浄後、20mlの0.1%TFA溶液を加え、4℃で30分間インキュベーションし、HLA結合ペプチドをHLA分子より遊離させた。この遊離させたHLA結合ペプチドは、10,000gで15分遠心分離し、細胞残さと分離した。

【0042】上述のごとくHST-2を培養して得たHLA結合ペプチド溶液20mlを、凍結乾燥し、5mlの0.1%TFA溶液で溶解した。このHLA結合ペプチド溶液1mlを逆相HPLCカラム(μ BONDSCHERE, 5μ C18-300A, 19X150mm)で20 处理した。なお、逆相HPLCカラムはあらかじめ、0.1%TFAを含む蒸留水で平衡化し、溶出液である0.1%TFA中のアセトニトリル濃度を0から80%までに直線的に増加させることにより溶出した。尚、流速は毎分1mlで行った。また、溶出液を1mlずつ分取した。上記の操作を10回繰返し、同一の保持時間を示す画分を集め、凍結乾燥した。なお、各回のHPLCの溶出パターンには有意な差異は認められなかった。HPLCの溶出パターンを図1に示す。

【0043】HPLC溶出画分中のTc-HST-2細胞に対するCTL誘導活性は以下のごとく測定した。即ち、標的細胞として、HLA-A31抗原を発現するHST-2もしくはKG-1細胞1X10⁶個を10%FCSを含むRPMI培地に細胞数1X10⁷個/mlとなるよう懸濁し、そこに100μlの⁵¹Cr-クロム酸ナトリウム/PBSを加え、5%CO₂存在下、37℃で3時間培養することにより⁵¹Crを標識した。⁵¹Crで標識された細胞1X10⁶個を100μlに懸濁し、これにHPLCで分離したHLA結合ペプチドを含む溶液3μlを加え、更に3時間同様の条件で培養した。これにより、HLA結合ペプチドをHLA分子に結合させた。その後、2.5X10⁶個/mlのTc-HST-2を100μl加え、更に12時間同様の条件で培養した。12時間培養の後、100μlの培養上清を採取しこの上清中に放出された⁵¹Crの放射活性をγカウンターで測定することにより、CTL活性を測定した。特異的細胞障害活性は以下の数式1に基づき計算した。

【0044】

【数1】特異的細胞障害活性 = (各穴の測定値 - 最小放出値) / (最大放出値 - 最小放出値) × 100

【0045】ただし、最小放出値は標的細胞のみのはいっている穴の測定値で、標的細胞からの⁵¹Crの自然遊離値を、そして最大放出値は標的細胞に界面活性剤トリトシン×100を加えて細胞を破壊した際の遊離値を示し

ている。結果を図2に示す。この図から分かるようにHPLCでの溶出分画の第12画分にCTL誘導活性が確認された。

【0046】Tc-HST-2に対するCTL誘導活性の確認された、第12画分を更に逆相HPLCカラム (μ BONDSCHE, 5μ C18-300A, 19X150mm) で処理した。なお、逆相HPLCカラムはあらかじめ、0.1%TFAを含む蒸留水で平衡化し、溶出液である0.1%TFA中のアセトニトリル濃度を0から40%までに直線的に増加させて溶出させた。尚、流速は毎分1mlで行った。また、溶出液を1mlずつ分取した。上記の操作を10回繰り返し、同一の保持時間を示す画分を集め、凍結乾燥した。尚、各回のHPLCの溶出パターンには有意な差異は認められなかった。HPLCの溶出パターンを図3に示す。

【0047】HPLC溶出画分中のTc-HST-2細胞に対するCTL誘導活性は前述と同様の方法を用い測定した。結果を図4に示す。この図から分かるように、HPLCでの溶出分画の第17画分にCTL誘導活性が確認された。

【0048】CTL誘導活性が確認された第17画分を分析用の逆相HPLCカラムで分離した (ZORBAX, ODS column, 4 mm x 250 mm)。尚、逆相HPLCカラムはあらかじめ、0.1%TFAを含む蒸留水で平衡化し、溶出液である0.1%TFA中のアセトニトリル濃度を0から60%までに直線的に増加させて溶出させた。尚、流速は毎分1mlで行い、主要なピークを得た。このピークを分取し、プロテインシーカー (ABI社製477A) に導入した。アミノ酸配列の決定方法はエドマン分解法に基づき行った。N末端からのアミノ酸配列は配列表の配列番号1記載の通りであった。

【0049】実施例2 胃癌抗原ペプチドの合成及びCTL誘導活性の測定

配列表の配列番号1記載のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を有する合成ペプチド1及び本ペプチドのN末端より9乃至7番目までのアミノ酸を含む3種のペプチド、即ちペプチド1-9 (配列表の配列番号2記載のアミノ酸配列を有するペプチド)、ペプチド1-8 (配列表の配列番号3記載のアミノ酸配列を有するペプチド) 及びペプチド1-7 (配列表の配列番号4記載のアミノ酸配列を有するペプチド) をペプチド自動合成機 (ABI社製477A) を用いて合成した。尚、合成は同機の取扱説明書のプロトコールに従った。本合成ペプチドは、レジンから切断した後に、TFA/ドライエーテルによって再沈澱させ、逆相HPLCで单一成分であることを確認すると共に質量分析計で確認した。その後、TNF放出法によるCTLアッセイに供した。即ち、標的細胞として、HLA-A31抗原を発現するHST-2細胞 1×10^6 個を $100\mu l$ 中に懸濁し、次に終濃度が $10\mu M$ 、 $1\mu M$ 又は $0.1\mu M$ となるように上記4種類の合成ペプチドを $5\mu l$ 加えた。更に3時間同様の条件で培養することにより、HLA結合ペプチドをHLA分子に結合させた。その後、 1×10^6 個/mlのTc-HST-2を $100\mu l$ 加

え、更に12時間同様の条件で培養した。12時間培養後、 $30\mu l$ の培養上清を採取し、この上清中に放出されたTNF活性を測定することによりCTL誘導活性を求めた。尚、TNF活性は以下の方法に基づき測定した。

【0050】すなわち、TNF感受性細胞であるWehi164細胞 7×10^4 個を $120\mu l$ に懸濁し、そこに $30\mu l$ の上記培養上清を加え、24時間培養した。培養後、各穴に $5mg/ml$ のMTTを $10\mu l$ 加え、更に3時間培養した。次に、 $150\mu l$ の0.01%塩酸を含むプロパノールを加え、培養中に生成されたホルマゾンを可溶化後、 $570nm$ の波長での吸光度を測定することにより、TNF活性を測定した。結果を図5に示す。図5から分かるように、合成ペプチド1及びペプチド1-9にTC-HST-2に対するCTL誘導活性が確認された (図5)。

【0051】実施例3 ヒトMKN28胃癌細胞株における該胃癌抗原ペプチドの発現

HST-2以外の胃癌細胞株にもTC-HST-2の認識する胃癌抗原ペプチドが発現しているか否か確認するため、HLA-A31陰性のヒト胃癌細胞株であるMKN28に対するTC-HST-2に

20 よる細胞障害活性を ^{51}Cr 放出法で検定した。 ^{51}Cr 放出法によるCTL活性の検定は実施例1と同様の方法を用いた。結果を図6に示す。HLA-A31を発現していないMKN28細胞に対しTC-HST-2は細胞障害活性を示さなかった。一方、MKN28にHLA-A31遺伝子を含むプラスミドpBJ-A31をエレクトロポレーション法によりトランスフェクトし、HLA-A31を発現するようになったMKN28のサブラインであるMKN28 A31(+)cl-2及びMKN28 A31(+)cl-5に対してはTC-HST-2は有意な細胞障害活性を示した (図6)。以上の結果よりTC-HST-2の認識する該胃癌抗原ペプチドがMKN2

30 8にも発現している事及び該ペプチドがHLA-A31分子に結合しTC-HST-2に認識されることが確認された。

【0052】

【発明の効果】本発明に係るペプチドは、ヒト胃癌細胞に対するCTLをin vivo又はin vitroにおいて誘導可能であり、当該ペプチドをそのまま又は当該ペプチドを含有する製剤はヒト胃癌の予防、治療剤として大いに期待できる。又、ヒト胃癌細胞に対するCTLをin vivo又はin vitroにおいて誘導可能なペプチドをコードするDNAを組換えDNAの形でウイルス又は細菌に含ませ得たものはヒト胃癌治療、予防用ワクチンとして充分薬効が期待される。

【0053】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ヒト

11

12

配列

Tyr Ser Trp Met Asp Ile Ser Cys Trp Ile
 1 5 10

【0054】配列番号：2

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ヒト

配列

Tyr Ser Trp Met Asp Ile Ser Cys Trp
 1 5

【0055】配列番号：3

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ヒト

配列

Tyr Ser Trp Met Asp Ile Ser Cys
 1 5

【0056】配列番号：4

配列の長さ：7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源：ヒト

配列

Tyr Ser Trp Met Asp Ile Ser
 1 5

【図面の簡単な説明】

【図1】 HST-2胃癌細胞からのHLA結合ペプチドの逆相HPLCカラムでの溶出パターンを示す。図中、直線はアセトニトリル濃度を示し、曲線は各濃度でのOD210での吸光度を示す。

【図2】 HST-2由来HLA結合ペプチドを用いた時のTc-H ST-2の特異的細胞障害活性を示す。○は標的細胞にHST- *

* 2を用いた場合の特異的細胞障害活性を、そして◆は標的細胞にHLA-A31陽性のKG-1細胞を用いた場合の細胞障害活性を示す。全ての実験CTL対標的細胞の比を100対1で行った結果を示した。

【図3】 図2でCTL誘導活性を示した第12画分の逆相HPLCカラムでの溶出パターンを示す。図中、直線はアセトニトリル濃度を示し、曲線は各濃度でのOD210での吸光度を示す。

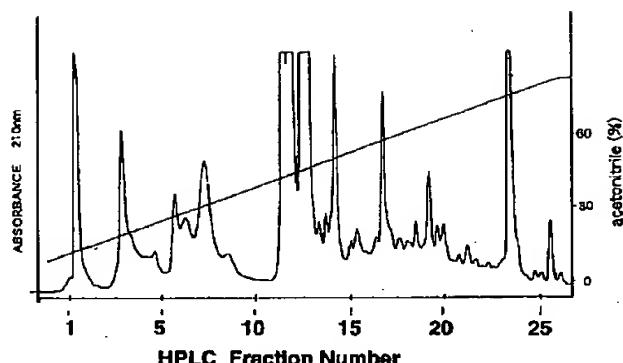
【図4】 HST-2由来HLA結合ペプチドを用いた時のTc-H ST-2の特異的細胞障害活性を示す。□は標的細胞にHST-2を用いた場合の特異的細胞障害活性を、そして◆は標的細胞にHLA-A31陽性のCCRF-CEM細胞を用いた場合の細胞障害活性を示す。全ての実験CTL対標的細胞の比を100対1で行った結果を示した。

【図5】 ペプチド1（配列表の配列番号1記載のペプチド）、ペプチド1-9（配列表の配列番号2記載のペプチド）、ペプチド1-8（配列表の配列番号3記載のペプチド）、及びペプチド1-7（配列表の配列番号4記載のペプチド）を用いたときのTNF放出法によるTc-HS

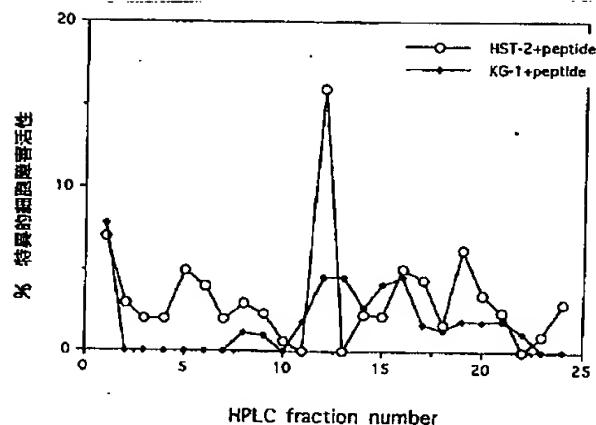
20 T-2のCTL誘導活性を示す。TNFの放出によりTNF感受性のWehi細胞が障害され、残存生細胞によるMTTの取り込みが低下する。ペプチド濃度は10mM、1mM、0.1mMである。全ての実験は標的細胞としてHST-2を用い、CTL対標的細胞の比を100対1で行った結果を示した。■は、ペプチド1を添加した場合の活性を、□はペプチド1-9添加した場合の、そして△はペプチド1-8を添加した場合の、○はペプチド1-7を添加した場合の、そして破線はペプチドを添加しなかった場合の細胞障害活性を示す。

30 【図6】 胃癌細胞株MKN28及びHLA-A31を人工的に発現させたサブラインであるMKN28 A31(+)cl-2、MKN28 A31(+)cl-5細胞を用いたときのTC-HST-2による細胞障害活性を示す。全ての実験はCTL対標的細胞の比を100対1で行った結果を示す。

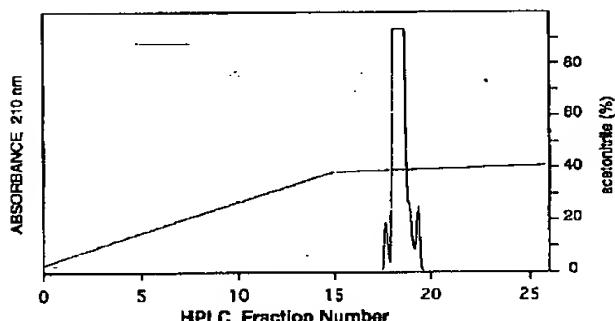
【図1】



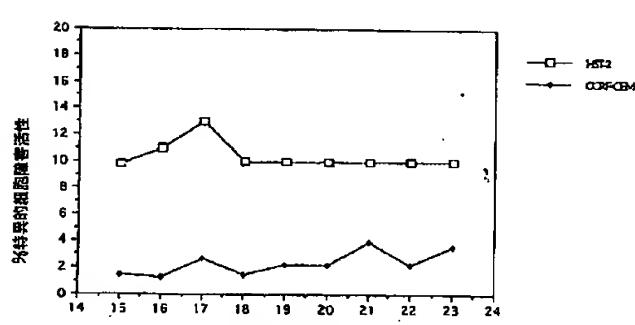
【図2】



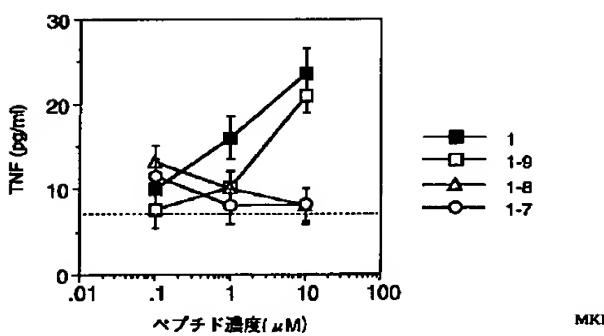
【図3】



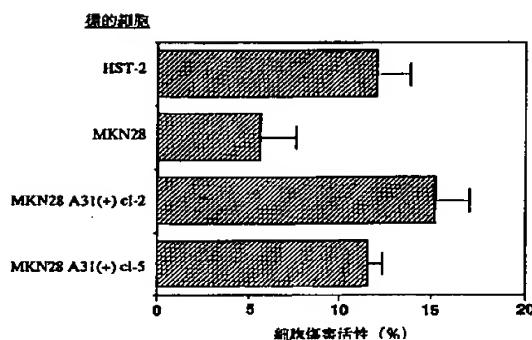
【図4】



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

A 6 1 K 38/00
39/00

識別記号

A E D
A D U

府内整理番号

F I

C 0 7 K 7/06
C 1 2 N 1/21

技術表示箇所

Z N A

48/00		7/00			
C 0 7 K	7/06	Z N A	A 6 1 K	37/02	A B A
C 1 2 N	1/21				A C J
	7/00				A E D
	15/09	9162-4B	C 1 2 N	15/00	A
//(C 1 2 N	1/21				
C 1 2 R	1:19)				

(72)発明者 佐原 弘益
北海道利尻郡利尻富士町鴛泊字栄町156番
3号

(72)発明者 八十島 孝博
北海道瀬棚郡今金町字今金45番4号

(72)発明者 和田 好正
北海道札幌市中央区南十二条西二十一丁目
1番5号505

(72)発明者 鈴木 学
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社中央研究所内

(72)発明者 羽室 淳爾
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の
素株式会社中央研究所内